

①⑨ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 198 52 167 A 1**

⑦① Aktenzeichen: 198 52 167.7  
⑦② Anmeldetag: 12. 11. 1998  
⑦③ Offenlegungstag: 31. 5. 2000

⑤① Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**G 01 N 27/62**  
C 12 N 15/00  
C 07 H 21/04  
C 07 H 1/00  
// G01N 33/68

DE 198 52 167 A 1

⑦① Anmelder:  
Bruker Saxonia Analytik GmbH, 04318 Leipzig, DE

⑦② Erfinder:  
Kostrzewa, Markus, 04451 Panitzsch, DE; Fröhlich,  
Thomas, 04157 Leipzig, DE; Wenzel, Thomas, 04328  
Leipzig, DE

⑤⑥ Entgegenhaltungen:  
DE 196 38 577 C1

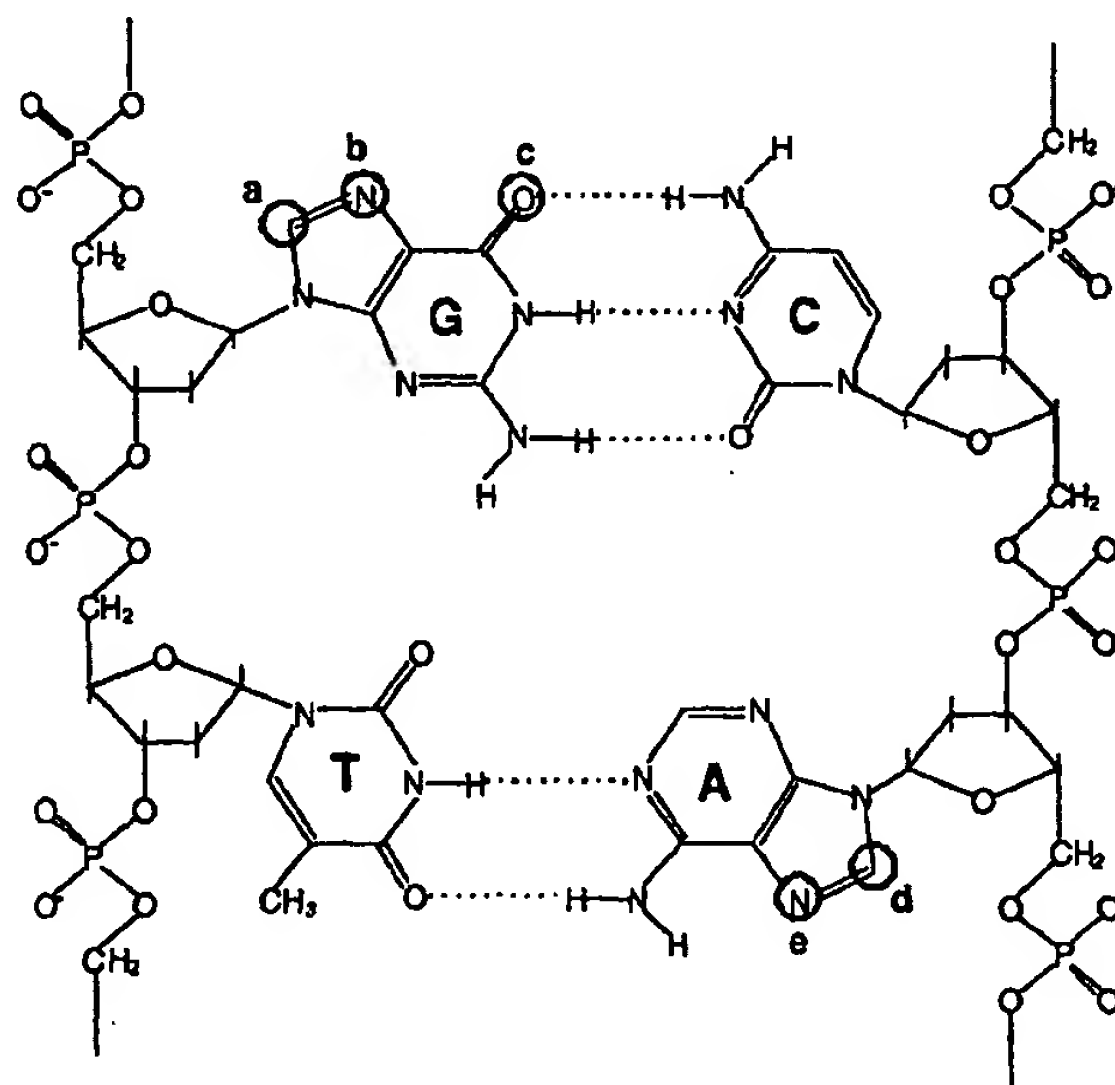
Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Einfache SNP-Analyse mittels Massenspektrometrie

⑤⑦ Die Erfindung betrifft ein Verfahren einer massenspektrometrischen Untersuchung des durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigten Genmaterials Desoxyribonukleinsäure (DNA) zur Identifizierung von bekannten Mutationen und Polymorphismen; insbesondere betrifft es die Analyse von einfachen Basenaustauschen (Einzelnukleotid-Austausche, single nucleotide polymorphisms, SNPs) mit Hilfe der Ionisierung durch matrix-unterstützte Laserdesorption (MALDI).

Die Erfindung besteht darin, für die selektive PCR-Vervielfältigung der DNA einen Satz an Nukleosidtriphosphaten zu verwenden, bei denen eines oder mehrere der Nukleosidtriphosphate durch das Anhängen einer chemischen Gruppe deutlich schwerer gemacht wurde, jedoch so, daß die Vervielfältigung durch die Polymerase nicht gestört wird. Dadurch kann ein Basenaustausch in DNA-Stücken mit etwa 40 bis 50 Basen Länge sehr leicht ohne weitere Manipulationen massenspektrometrisch sichtbar gemacht werden.



DE 198 52 167 A 1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren einer massenspektrometrischen Untersuchung des durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigten Genmaterials Desoxyribonukleinsäure (DNA) zur Identifizierung von bekannten Mutationen und Polymorphismen; insbesondere betrifft es die Analyse von einfachen Basenaustauschen (Einzelnukleotid-Austausche, single nucleotide polymorphisms, SNPs) mit Hilfe der Ionisierung durch matrix-unterstützte Laserdesorption (MALDI).

Die Erfindung besteht darin, für die selektive PCR-Vervielfältigung der DNA einen Satz an Nukleosidtriphosphaten zu verwenden, bei denen eines oder mehrere der Nukleosidtriphosphate durch das Anhängen einer chemischen Gruppe deutlich schwerer gemacht wurde, jedoch so, daß die Vervielfältigung durch die Polymerase nicht gestört wird. Dadurch kann ein Basenaustausch in DNA-Stücken mit etwa 40 bis 50 Basen Länge sehr leicht ohne weitere Manipulationen massenspektrometrisch sichtbar gemacht werden.

#### Stand der Technik

Gegenstand dieser Erfindung ist eine Methode zum leichten und schnellen Nachweis von mutativen Veränderungen an bestimmten, vorbekannten Stellen der genomischen DNA eines Organismus. Insbesondere werden hier Polymorphismen betrachtet, bei denen an einer bestimmten Stelle im Genom statistisch häufig ein einzelner Basenaustausch zu finden ist. Diese Art von Polymorphismen ist in den letzten Jahren mit der Bezeichnung "single nucleotide polymorphism" (SNP) belegt geworden.

SNPs haben inzwischen eine überragende Bedeutung für Genotypisierungen erlangt. Im menschlichen Genom werden etwa 3 Millionen solcher SNPs vermutet. Es gibt also etwa 3 Millionen Stellen, an denen statistisch häufig eine Base gegen eine andere Base ausgetauscht ist. Ein solcher Basenaustausch kann innerhalb eines Genes oder auch in nicht exprimierten Bereichen zwischen den Genen liegen. Daher und auch wegen der großen Redundanz des genetischen Codes kann ein SNP ohne phänotypische Auswirkung sein. Bestimmte Zustandsformen (sogenannte Allele) von SNPs können jedoch auch mit einer phänotypischen Variation verbunden sein, z. B. durch den Austausch einer Aminosäure in einem Protein, durch eine Änderung der Genexpression oder ihrer Regulation etc. Die phänotypische Variation kann z. B. in einer veränderten Toleranz gegen Umwelteinflüsse, in einer veränderten Arzneimittelwirkung oder im Extremfall in einer genetisch bedingten Erkrankung zum Ausdruck kommen. SNPs vererben sich je zur Hälfte von Vater und Mutter, daher können SNPs auch zur Individualanalyse (genetischer Paß) herangezogen werden.

Eine wachsende Bedeutung kommt SNPs für die Genotypisierung und insbesondere für die Kopplungsanalyse von multikausalen Krankheiten zu. Dabei sind die größere Häufigkeit im Genom und das damit mögliche dichtere Markernetzwerk sowie die geringere Mutationsrate gegenüber den bislang verwendeten STRP-Markern (short tandem repeat polymorphisms) von großem Vorteil.

Grundlage für den Nachweis solcher und anderer Mutationen ist die selektiv arbeitende PCR ("polymerase chain reaction"), eine Vervielfältigungsmethode für DNA-Stücke im Reagenzglas, die erst 1983 von K. B. Muliis (dafür Nobelpreis 1993) entwickelt wurde und nach der Einführung temperaturstabiler Polymerasen einen beispiellosen Siegeszug durch die genetischen Laboratorien angetreten hat.

PCR ist die gezielte Vervielfältigung eines genau durch

die Vervielfältigungsmethode selbst ausgesuchten Stückes der zweisträngigen DNA (dsDNA). Die Auswahl des DNA-Segments erfolgt durch ein Paar von sogenannten Primern, zweier Einzelstrang-DNA-Stücke (ssDNA) mit je etwa 20 Nukleotiden Länge, die (etwas verkürzt und vereinfacht beschrieben) an beiden Seiten (den zukünftigen Enden) des ausgesuchten DNA-Stückes hybridisieren. Die enzymatische Vervielfältigung erfolgt durch eine DNA-Polymerase, die eine chemische Fabrik in einem Molekül darstellt, durch Durchlaufen eines einfachen Temperaturzyklus. Die PCR-Reaktion läuft in wäßriger Lösung ab, in der wenige Moleküle der Ausgangs-DNA und genügende Mengen an DNA-Polymerase, Primern, Nukleosidtriphosphaten, Aktivatoren und Stabilisatoren vorhanden sind. In jedem Temperaturzyklus (beispielsweise Aufschmelzen der Doppelhelix bei 94°C, Hybridisieren der Primer bei 55°C, Wiedervervollständigung zu einer Doppelhelix durch Anbau neuer DNA-Bausteine durch die Polymerase bei 72°C) wird die Anzahl der ausgewählten DNA-Segmente im Prinzip verdoppelt. In 30 Zyklen werden also aus einem einzigen Doppelstrang der DNA als Ausgangsmaterial rund eine Milliarde DNA-Segmente erzeugt. (In strenger Beschreibung hybridisieren die beiden Primer auf den beiden verschiedenen Einzelsträngen der DNA und die Verkürzung auf das ausgewählte DNA-Segment einschließlich der beiden anhängenden Primer tritt erst statistisch bei weiterem Vervielfachen auf).

Massenspektrometrie mit Ionisierung schwerer Moleküle entweder durch matrix-unterstützte Laserdesorption (MALDI) oder durch Elektrosprühen (ESI) ist eine sehr leistungsfähige Art der Analyse von Biomolekülen. Die Ionen können beispielsweise in Flugzeitmassenspektrometern auf ihre Masse hin analysiert werden. Da die Fluggeschwindigkeit der Ionen im Massenspektrometer etwa  $10^7$  mal schneller ist als die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle im Gel der Elektrophorese, ist das massenspektrometrische Verfahren außerordentlich viel schneller als die bisher meist eingesetzten gelelektrophoretischen Verfahren, selbst wenn die Spektrenmessung 10- bis 100-mal wiederholt wird, um zu guten Signal-zu-Rausch-Verhältnissen zu kommen.

Wegen der Fähigkeit zu höherem Probendurchsatz hat sich für die Analyse von DNA bisher das MALDI-Verfahren gegenüber ESI durchgesetzt. Das MALDI-Verfahren besteht darin, daß zunächst die Analytmoleküle auf einem festen Probenträger in eine feste, UV-absorbierende Matrix, meist eine organische Säure, eingebettet werden. Der Probenträger wird in die Ionenquelle eines Massenspektrometers eingeführt. Durch einen kurzen UV-Laserpuls von etwa 3 Nanosekunden Länge wird die Matrix ins Vakuum verdampft; das Analytmolekül wird dabei weitgehend unfragmentiert in die Gasphase befördert. Durch Stöße mit gleichzeitig entstehenden Matrixionen wird die Ionisation des Analytmoleküls erreicht. Eine angelegte Spannung beschleunigt die Ionen in ein feldfreies Flugrohr. Auf Grund ihrer verschiedenen Massen werden die Ionen in der Ionenquelle auf unterschiedliche Geschwindigkeiten beschleunigt. Kleinere Ionen erreichen den Detektor früher als größere. Die Flugzeit wird in die Masse der Ionen umgerechnet.

Technische Neuerungen der Hardware haben die Methode der Flugzeitmassenspektrometrie mit MALDI-Ionisierung signifikant verbessert. Erwähnenswert ist die zeitverzögernd einsetzende Beschleunigung (Delayed Extraction), mit der eine verbesserte Auflösung der Signale an einer Stelle im Spektrum, aber auch eine noch geringere Fragmentierung, erreicht wird. Durch eine zusätzliche dynamische Veränderung der Beschleunigungsspannung kann man eine gute Auflösung in einem weitem Massenbereich erreichen (siehe beispielsweise DE 196 38 577).

Selbstverständlich kann das MALDI-Verfahren zur Ioni-

sierung aber auch mit anderen Arten der Massenspektrometrie gekoppelt werden, wie beispielsweise mit Hochfrequenz-Quadrupol-Ionenfallen oder Ionenzyklotron-Resonanz-Spektrometern.

MALDI eignet sich ausgezeichnet zur Analyse von Peptiden und Proteinen. Die Analyse von Nukleinsäuren ist weit schwieriger. Für Nukleinsäuren ist die Ionisierung im MALDI-Prozeß etwa 100-mal geringer als für Peptide und nimmt mit zunehmender Masse überproportional ab. DNA-Stücke sind einerseits sehr fragil und zerfallen leicht im MALDI-Prozeß, andererseits neigen sie zur Adduktbildung. Beide Prozesse der Fragmentierung und Adduktbildung führen dazu, daß mit größer werdender Masse die Bestimmung der Masse rasch immer ungenauer wird.

Kann man ein DNA-Stück von 20 bis 25 Basen Länge (rund 6000 bis 8000 atomare Masseneinheiten) noch auf etwa drei bis fünf atomare Masseneinheiten genau bestimmen, so ist das für DNA der Länge von etwa 40 bis 50 Basen (rund 12 000 bis 16 000 atomare Masseneinheiten) nicht mehr der Fall. Hier braucht man bereits eine Massendifferenz von etwa 40 bis 60 Masseneinheiten für eine sichere Unterscheidung. Die vier natürlich vorkommenden Nukleobasen der DNA haben aber nur Massenunterschiede von 9 bis maximal 40 atomaren Masseneinheiten, ein Basenaustausch ist also bei dieser Länge der DNA-Stücke nicht mehr sicher zu erkennen. Nur bei sorgfältigstem Arbeiten und extrem gutem Reinigen, um die Adduktbildung gering zu halten, kann man in diesem Massenbereich noch Massenunterschiede von 20 atomaren Masseneinheiten erkennen.

Nun ist die Mindestlänge eines PCR-amplifizierten DNA-Produkts um ein SNP (single nucleotide polymorphism) herum etwa 40 bis 50 Basen, da ja zwei Primer mit etwa 20 Basen Länge verwendet werden müssen, und sich die Primer manchmal nicht unmittelbar an die SNP-Stelle anschließen lassen. Für diese PCR-Produkte ist daher eine sichere, massenspektrometrische Erkennung eines Basenaustauschs durch die sonst so bequeme und schnelle MALDI-Ionisierung nicht mehr gegeben.

Es ist vor kurzem ein Verfahren zur Mutationsdiagnostik bekannt geworden, das die MALDI-Massenspektrometrie benutzt und das besonders für die SNP-Analyse eingesetzt werden kann (Little, D. P., Braun, A., Darnhofer-Demar, B., Frilling, A., Lai, Y., McIver, R. T. and Köster, H.; Detection of RET proto-oncogene codon 634 mutations using mass spectrometry. J. Mol. Med. 75, 745-750, 1997). Dabei wird zunächst mit einem Paar von Erstprimern eine normale PCR durchgeführt, um genügend DNA-Material für die weitergehenden Schritte zur Verfügung zu haben. Nach Zwischenreinigung zur Entfernung von Restprimern und Nukleosidtriphosphaten wird dann ein neuer Primer zugegeben. Dieser Zweitprimer wird dabei so synthetisiert, daß er sich in der Nähe einer bekannten Punktmutation bzw. eines SNPs an den Matrizenstrang anlagert. Zwischen der Position dieses SNPs und dem 3'-Ende des Primers (an diesem Ende wird der Primer verlängert) darf die Sequenz des Matrizenstrangs maximal drei der vier Nukleobasen enthalten. Die vierte Base tritt frühestens an der Stelle des SNPs (im Falle Allel 1 des Polymorphismus) oder dahinter (Allel 2) zum ersten Mal auf. Mit einer Polymerase und einem besonderen Satz von Desoxynukleosidtriphosphaten (die maximal drei komplementären, die bis zum Polymorphismus auftreten) und einem Didesoxynukleosidtriphosphat (mit der Base, die komplementär zu einem Allel des Polymorphismus ist) wird der Primer dann kopierend verlängert. Das Didesoxynukleosidtriphosphat beendet ("terminiert") die Kettenverlängerung. Je nach vorliegendem Allel des Polymorphismus wird die Kettenverlängerung am SNP oder einige Nukleotide später terminiert. Dieses Verfahren ist von den Autoren als

"PROBE" bezeichnet worden.

Diese Methode ist sehr günstig, da sie mit kurzen DNA-Produkten von etwa 25 Nukleotiden Länge endet, die sich gut für eine MALDI-Analyse eignen, und da der Massenunterschied immer mindestens eine Base beträgt. Sie verlangt aber andererseits eine größere Anzahl von Temperatur- und Reinigungsschritten. Zunächst müssen die PCR-Produkte vom Erstprimer, vom Enzym und allen Nukleosidtriphosphaten gereinigt werden, wobei zu bedenken ist, daß die Aufreinigung, besonders vom Primer, immer schwieriger wird, je kürzer das zu reinigende DNA-Produkt ist. Dann erst kann der Zweitprimer, der verlängert werden soll, mit dem besonderen Satz an Nukleosidtriphosphaten zugegeben werden. Es ist jetzt ein neuer Thermozyklus für die Verlängerung des Primers einzuschalten. Dann muß wiederum gereinigt werden, bevor das Verlängerungsprodukt mit MALDI gemessen werden kann. Die Autoren haben diese Schritte dadurch gelöst, daß sie die DNA an einer Oberfläche nicht nur physikalisch-adsorptiv, sondern chemisch fixieren, später aber wieder lösen müssen, was aber die Reaktionen nochmals kompliziert.

#### Aufgabe der Erfindung

Es ist die Aufgabe der Erfindung, durch einfache PCR-Vervielfältigung ohne weitere enzymatisch oder chemisch verändernden Schritte zu PCR-Produkten zu kommen, die sich für die sichere Typisierung eines Polymorphismus bzw. Identifizierung einer Punktmutation durch eine massenspektrometrische Messung eignen, insbesondere durch eine Messung mit MALDI-Ionisierung.

#### Kurze Beschreibung der Erfindung

Die Erfindung besteht darin, jeweils mindestens eins der in der PCR-Amplifizierung eingesetzten vier Nukleosidtriphosphate durch eine chemische Veränderung so in seiner Masse zu verändern (derivatisieren), daß einerseits dadurch die PCR-Reaktion nicht gestört wird, aber andererseits ein Basenaustausch durch die dann stark veränderte Masse des PCR-Produkts sicher erkennbar wird. Es ist dabei von der Art des Basenaustauschs abhängig, welches Nukleosidtriphosphat am günstigsten massenverändert eingesetzt wird.

Eine Derivatisierung führt leichter zu einer Massenvergrößerung als zu einer Verkleinerung. Diese Vergrößerung braucht im Falle des Nukleosidtriphosphats (G) nur etwa 14 atomare Masseneinheiten zu betragen, um diese Base sicher in einem Austausch durch eine der beiden leichtesten Nukleosidtriphosphate (C und T) zu erkennen. Besser ist jedoch ein Massenunterschied von mindestens 20 atomaren Masseneinheiten; ideal für dieses Verfahren sind jedoch 40 bis 80 atomare Masseneinheiten als Derivatisierungszuwachs.

Es werden dazu nicht einmal massenveränderte Nukleosidtriphosphate für alle vier Basen benötigt. Zwei in der Masse veränderte Nukleosidtriphosphate reichen für die Erkennung aller Basenaustausche aus, da ja die Basen im DNA-Strang und -Gegenstrang immer paarweise (G und C, A und T) vorkommen. Günstigerweise sind dabei die beiden schwersten Nukleosidtriphosphate (G und A) in der Masse zu vergrößern. Die Massenveränderung braucht aber nur in einem Strang erkennbar zu sein. Normalerweise (wenn nicht besondere Maßnahmen getroffen werden) werden im MALDI-Prozeß immer beide Stränge gleichzeitig gemessen. Bei Benutzung nur eines Stranges (auch dafür sind Verfahren vorhanden) kann der zur Messung benutzte Strang entsprechend ausgesucht werden.

Die Nukleobasen bestehen aus den beiden Purinen Ade-



nin (A) und Guanin (G) und aus den beiden Pyrimidinen Cytosin (C) und Thymin (T). (In der RNA kommt statt des Thymins das Uracil (U) vor). Aus Strukturgründen lassen sich nach jetziger Kenntnis G und A leichter derivatisieren, was aber im Sinne der Erfindung sowieso günstiger ist. Eine Derivatisierung der Pyrimidine ist aber nicht ausgeschlossen.

Es ist im besonderen eine Grundidee der Erfindung, die Purine A und G in Stellung 7 zu derivatisieren (Buchstaben b und e in Abb. 1). Dazu ist es erforderlich, die Stickstoffatome der Stellung 7 durch Methin-Gruppen auszutauschen. Als Ergebnis erhält man 7-Desaza-Purinnukleoside, die anschließend in Triphosphate überführt werden. Der Wasserstoff am C-Atom in Stellung 7 wird dann durch eine entsprechend schwere Gruppe ersetzt. Dabei kann man sehr verschiedene Gruppen verwenden. Insbesondere können die modifizierten Purinnukleoside in Stellung 7 durch Anhängen von Resten der Form -R,  $-(CH_2)_n-R$  oder  $-C\equiv C-R$  derivatisiert werden, wobei R ein Rest der Form -H, -F, -Cl, -Br, -I, -OH, -SH, -SeH, -Alkyl, -Alkenyl, -Alkynyl,  $-OCH_3$ ,  $-SCH_3$ ,  $-CHF_2$ ,  $-CF_3$ ,  $-CH_2CH_2-(OCH_2CH_2)_n-O-Alkyl$ ,  $-NH_2$ ,  $(NHCOCH_2)_n-NH_2$ ,  $-(NHCOCHCH_3)_n-NH_2$ ,  $-OCOCH_2NH_2$ ,  $OCOCH_2(NHCOCH_2)_n-NH_2$ ,  $-OCOCHCH_3NH_2$ ,  $-OCOCHCH_3(NHCOCH_3)_n-NH_2$ ,  $-OCH_2F$ ,  $-OCHF_2$ ,  $-OCF_3$ ,  $-SCH_2F$ ,  $-SCHF_2$  oder  $-SeCH_3$  sein kann, soweit sich dadurch ein Massenunterschied von mindestens 14, günstiger jedoch von mindestens 20 oder besser noch 40 atomaren Masseneinheiten ergibt. Dem Fachmann sind darüberhinaus weitere Reste bekannt, die den gleichen Zweck erfüllen.

Weiterhin besteht die Möglichkeit 8-Aza-7-Desaza-Purinnukleoside wie oben beschrieben zu derivatisieren. Auch die Stellung 6 des Guanins, an der normalerweise ein Sauerstoffatom hängt, kann zur Massenmodifikation derivatisiert werden. So ist es möglich, hier ein Schwefel- oder Selenatom einzubauen, ohne die Watson-Crick-Bindung zur gegenüberliegenden Pyrimidinbase wesentlich zu stören.

Zur Massenmodifikation kann auch in der Desoxyribose O1' durch S1' substituiert werden. Auch kann ein DNA-Baustein durch ein Phosphothioat ersetzt werden.

Es ist weiter eine Basisidee der Erfindung, für diese SNP-Analyse entsprechende Chemikalien-Kits herzustellen. Diese können einerseits nur die modifizierten Nucleosidtriphosphate enthalten, beispielsweise in Mischungen mit unmodifizierten Nucleosidtriphosphaten. Es können aber auch Puffer, Aktivatoren für die Polymerase und Stabilisatoren enthalten sein. Es ist aber auch möglich, gebrauchsfertige Kits herzustellen, die auch schon die inaktivierte Polymerase enthalten und denen bei Gebrauch nur noch die spezifischen Primer und Aktivatoren zugegeben werden müssen.

#### Beschreibung der Abbildungen

Abb. 1 zeigt einen Ausschnitt aus einem genomischen Doppelstrang mit den vier Basen A, C, G und T in paarweiser Bindung nach Watson-Crick (zwei oder drei Wasserstoffbrücken-Bindungen). Die besonders für eine Derivatisierung an 7-Desaza-Nukleotiden geeignete Position 7 ist durch den Buchstaben b am Guanin G, und durch den Buchstaben e am Adenosin A gekennzeichnet. Die Buchstaben a und d kennzeichnen die günstigerweise zu azalierenden Stellen 8 der beiden Purine G und A. Der Buchstabe c kennzeichnet den Sauerstoff an Stellung 6 des Guanins, der sich durch Schwefel oder Selen ersetzen läßt.

Abb. 2 zeigt die 7-Desaza-Purinnukleoside und deren mögliche Derivatisierungen zur Massenmodifikation. Die Zahlen 1, 3, 5, 7, 9 numerieren die Purinatome des Ringsystems in der gewöhnlich angewandten, sogenannten "Purin-

zählweise".

#### Besonders günstige Ausführungsformen

Eine besonders günstige Ausführungsform ist die Derivatisierung eines ein 8-Aza-7-Desaza-Guaninnukleosidtriphosphat an der Stelle 7 mit einer  $-C\equiv C-CH_2NH_2$ -Gruppe (Propargylamino-Gruppe). Dadurch wird die Base Guanin um 53 atomare Masseneinheiten schwerer. Da die Base Guanin bereits um 40 atomare Masseneinheiten schwerer ist als die leichteste Base Cytosin und 16 atomare Masseneinheiten schwerer als die nächstschwere Base Adenin, ist ein das Guanin betreffender Basenaustausch sehr leicht massenspektrometrisch zu detektieren, selbst wenn massenspektrometrisch nicht optimale Verhältnisse eingehalten werden können.

Aber auch eine Derivatisierung der gleichen Stelle mit einer Ethinylgruppe  $-C\equiv CH$  führt bereits zu einer normalerweise unterscheidbaren Situation. Der Massenunterschied beträgt hier zwar nur 23 atomare Masseneinheiten, da jedoch Guanin bereits um 40 atomare Masseneinheiten schwerer ist als die leichteste Base, kann dieser Unterschied bei einigermaßen sorgfältiger Massenspektrometrie sicher erkannt werden.

Des weiteren ist eine Bromierung an der Stelle 7 des 8-Aza-7-Desaza-Guaninnukleosidtriphosphats günstig. Dadurch ergibt sich ein Massenzuwachs von etwa 80 atomaren Masseneinheiten. Es stört dabei nicht, daß Brom aus zwei Isotopen besteht, sie lassen sich massenspektrometrisch bei dieser Art der Analyse nicht auflösen.

Eine solche Massendifferenz von etwa 80 Masseneinheiten ist für den vorliegenden Zweck ideal. Die durchschnittliche Masse eines Nukleotids, die normalerweise etwa 310 atomare Masseneinheiten beträgt, wird dadurch auf etwa 330 Masseneinheiten erhöht. Die Massenerhöhung einer Base sollte nach Möglichkeit unter 80 bis 120 atomaren Masseneinheiten bleiben, da sonst die Möglichkeiten des Verfahrens zum Multiplexen eingeschränkt werden.

Das Multiplexen besteht darin, in einem PCR-Gang nicht nur ein SNP, sondern gleichzeitig durch mehrere Primerpaare mehrere SNPs zu untersuchen. Dazu ist es erforderlich, die Massen der dadurch entstehenden Produkte so planen, daß sich die dadurch jeweils entstehenden Massenbereiche der beiden Allelen der verschiedenen SNPs nicht überlappen.

Das Verfahren nach dieser Erfindung bietet gegenüber allen anderen bisher bekannt gewordenen Verfahren große Vorteile:

1. Das Verfahren ist unübertroffen einfach; es braucht nur eine einzige PCR-Vervielfältigung, eine einmalige Reinigung und dann die massenspektrometrische Analyse.
2. Die Reinigung ist gegenüber anderen Verfahren viel einfacher, weil größere doppelsträngige DNA-Produkte zu reinigen sind. Selbst die weitgehende Beseitigung der Primer ist einfacher (obwohl nicht unbedingt notwendig), da der Massenunterschied bedeutend ist. Als Reinigungsverfahren kann beispielsweise die Aufreinigung in Pipettenspitzen (Reversed-Phase-Chromatographie) verwendet werden. Solche Pipettenspitzen sind bereits kommerziell erhältlich. Es kann aber auch eine Aufreinigung durch gezielte Adsorption an Magnetpartikeln (Magnetic Beads) verwendet werden, für die es kommerzielle Apparaturen gibt, die sich in Pipettierautomaten integrieren lassen.

Damit ist eine Automatisierung der Probenvorbereitung

für eine MALDI- oder auch ESI-Massenspektrometrie leicht möglich. Es gibt bereits Pipettierroboter mit integrierten Thermocyclern für die Durchführung der PCR. Die Automatisierung ist für die Analyse von SNPs stark wünschenswert, weil in der Regel für die Genotypisierung, insbesondere aber für Kopplungsanalysen von Krankheiten mit Genioci und für statistische Bioinformatik jeweils Zehntausende von Proben zu analysieren sind.

Die Arten der massenverändernden Derivatisierungen sind hier nicht vollständig angegeben. Der Fachmann, insbesondere der biochemisch arbeitende Synthetiker, kann auf der Grundlage der Erfindungsidee leicht weitere Derivatisierungsmöglichkeiten angeben, die dem Erfindungszweck entsprechen.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur massenspektrometrischen Analyse bekannter Polymorphismen oder Mutationen in genomischer DNA, mit selektiver Vervielfältigung kurzer, die polymorphe Stelle umfassender DNA-Stränge durch PCR, **dadurch gekennzeichnet**, daß von den vier Nukleosidtriphosphaten, die bei der PCR eingesetzt werden, mindestens eines durch chemische Veränderung (Derivatisierung) in seiner Masse verändert ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Massen des veränderten Nukleosidtriphosphat-Derivate um mindestens 14 atomare Masseneinheiten schwerer sind als das der unveränderten Nukleosidtriphosphate derselben Art.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß zur weiteren Veränderung der Basen A und G die bereits modifizierten 7-Deaza-Purinnukleosidtriphosphate oder 8-Aza-7-Deaza-Purinnukleosidtriphosphate eingesetzt werden.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die 7-Deaza-Purinnukleosidtriphosphate oder 8-Aza-7-Deaza-Purinnukleosidtriphosphate in Stellung 7 weiter derivatisiert werden.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die modifizierten Purinnukleosidtriphosphate in Stellung 7 durch Anhängen von -R,  $-(CH_2)_n-R$  oder  $-C \equiv C-R$  derivatisiert werden, wobei R einen Rest der Form -H, -F, -Cl, -Br, -I, -OH, -SH, -SeH, -Alkyl, -Alkenyl, -Alkinyl,  $-CHF_2$ ,  $-CF_3$ ,  $-OCH_3$ ,  $-OCH_2F$ ,  $-OCHF_2$ ,  $-OCF_3$ ,  $-SCH_3$ ,  $-SCH_2F$ ,  $-SCHF_2$ ,  $-(OCH_2CH_2)_n-O-Alkyl$ ,  $-NH_2$ ,  $-(NHCOCH_2)_n-NH_2$ ,  $-(NHCOCHCH_3)_n-NH_2$ ,  $-OCOCH_2NH_2$ ,  $OCOCH_2(NHCOCH_2)_n-NH_2$ ,  $OCOCHCH_3(NHCOCH_3)_n-NH_2$ ,  $-OCOCHCH_3NH_2$  oder  $-SeCH_3$  kennzeichnet, soweit dadurch eine Massenerhöhung um mindestens 14 atomaren Masseneinheiten erzeugt wird.
6. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche 3 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß für die Base G zusätzlich zu anderen Modifikationen der Sauerstoff an Stellung 6 durch Schwefel oder Selen ersetzt wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Desoxy-Ribose-Einheit des Nukleosidtriphosphats derivatisiert wird.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß ein Nukleosid am  $\alpha$ -Phosphor-Atom derivatisiert wird.
9. Chemikalien-Kit mit Nukleosidtriphosphaten für die PCR eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Masse von mindestens einem der enthaltenen Nukleosidtriphosphate

durch Derivatisierung um mindestens 14 atomare Masseneinheiten erhöht ist.

10. Chemikalien-Kit nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß bis auf die Primer alle für die PCR notwendigen Enzyme, Puffer, Aktivatoren, modifizierten und unmodifizierten Nukleosidtriphosphate im Kit enthalten sind.

---

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

---

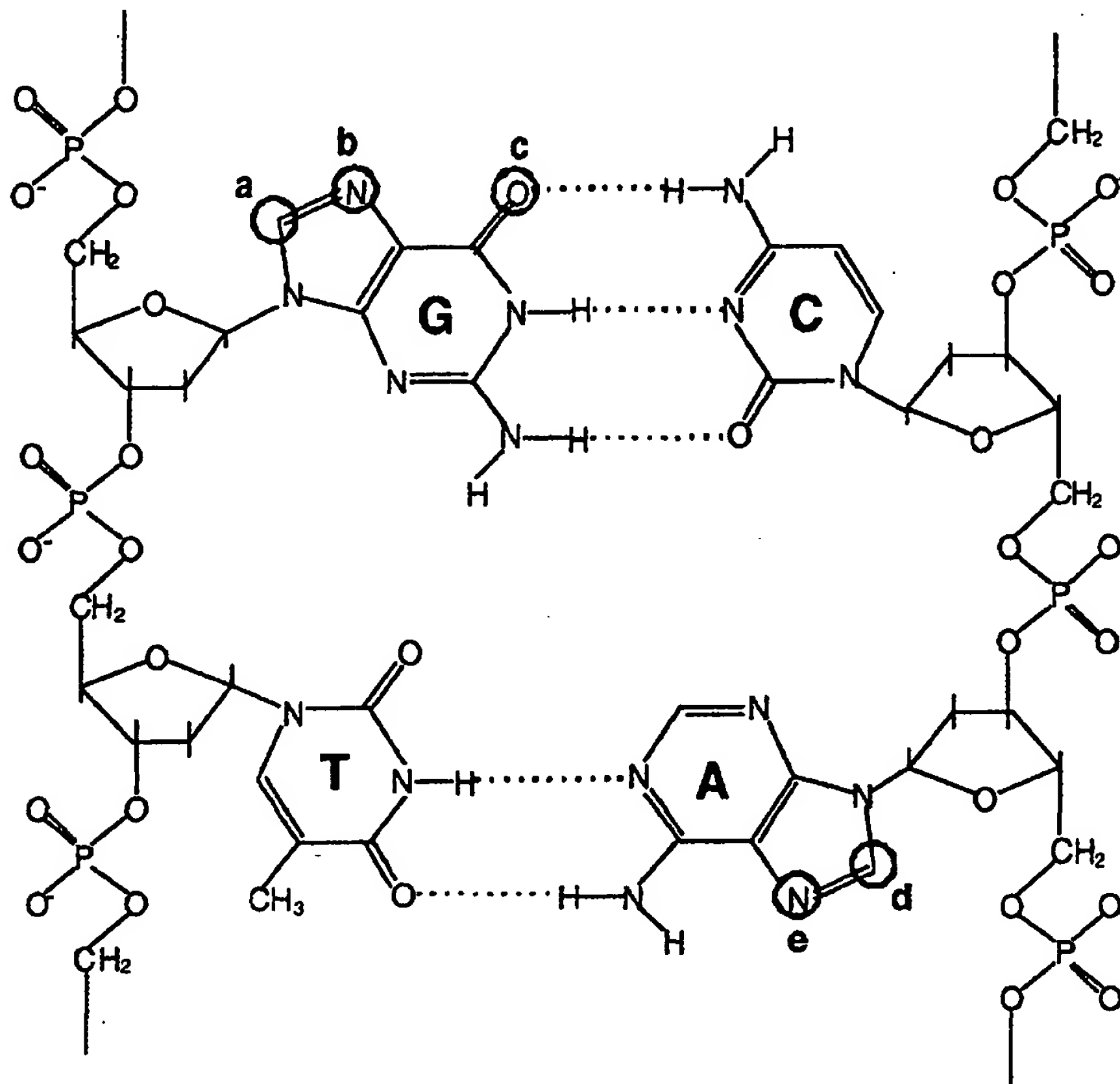
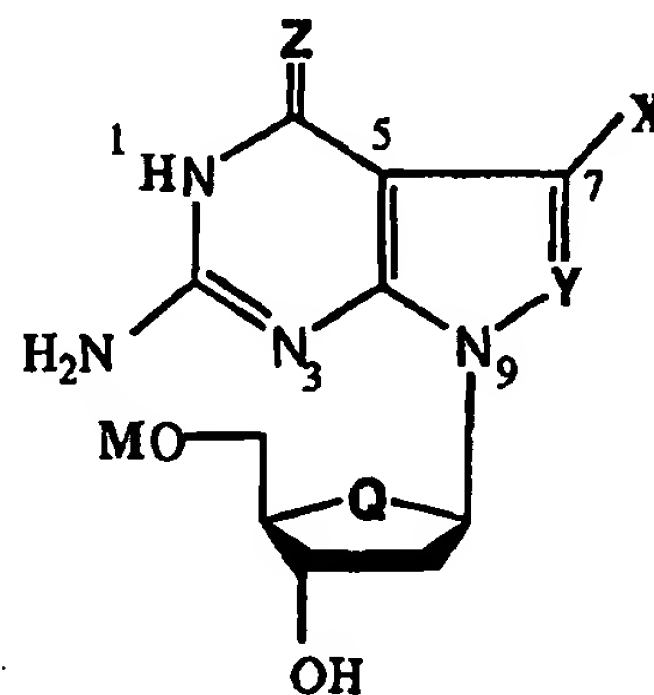
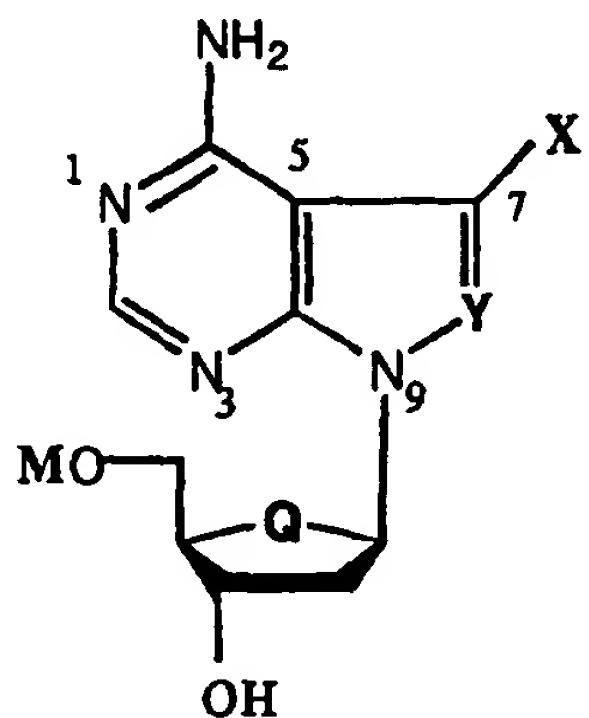


Abbildung 1



$M = -P_3O_9H_4, -P_3O_8SH_4$

$Q = O, S$

$X = -R, -(CH_2)_n-R, -C\equiv C-R$

$R = -H, -F, -Cl, -Br, -I, -OH, -SH, -SeH, -Alkyl, -Alkenyl, -Alkynyl, -OCH_3, -SCH_3,$   
 $-(OCH_2CH_2)_n-O-Alkyl, -NH_2, -(NHCOCH_2)_n-NH_2,$   
 $-(NHCOCHCH_3)_n-NH_2, -OCOCH_2NH_2, -OCOCH_2(NHCOCH_2)_n-$   
 $NH_2, -OCOCHCH_3NH_2, -OCOCHCH_3(NHCOCH_3)_n-NH_2, -CHF_2, -CF_3,$   
 $-OCH_2F, -OCHF_2, -OCF_3, -SCH_2F, -SCHF_2, -SeCH_3$

$Y = CH, N$

$Z = O, S, Se$

Abbildung 2